



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Efeito da metformina sobre a via de sinalização do IGF-1R no câncer de endométrio**

Vânia Marísia Santos Fortes dos Reis

Porto Alegre, julho de 2023.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Efeito da metformina sobre a via de sinalização do IGF-1R no câncer de endométrio**

Vânia Marísia Santos Fortes dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2023.

### CIP - Catalogação na Publicação

Reis, Vânia Marisia Santos Fortes dos  
Efeito da metformina sobre a via de sinalização do  
IGF-1R no câncer de endométrio / Vânia Marisia Santos  
Fortes dos Reis. -- 2023.  
89 f.  
Orientador: Edison Capp.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. câncer endometrial. 2. metformina. 3. IGF-1R. I.  
Capp, Edison, orient. II. Título.

*“It is not the critic who counts; not the man who points out how the strong man stumbles, or where the doer of deeds could have done them better. The credit belongs to the man who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood; who strives valiantly; who errs, who comes short again and again, because there is no effort without error and shortcoming; but who does actually strive to do the deeds; who knows great enthusiasms, the great devotions; who spends himself in a worthy cause; who at the best knows in the end the triumph of high achievement, and who at the worst, if he fails, at least fails while daring greatly, so that his place shall never be with those cold and timid souls who neither know victory nor defeat.”*

– Theodore Roosevelt

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Professor Dr. Edison Capp, pela orientação e por me permitir crescer, incentivando a minha formação em todos os sentidos. Sempre vou lembrar de todo o apoio com muito carinho.

À Professora Dra. Ilma Simoni Brum da Silva por sempre contribuir com conhecimento, experiência, mas, também, com exemplo. Sempre será referência e admiração.

À Professora Dra. Helena von Eye Corleta e à Professora Dra. Lúcia Maria Kliemann pelo carinho que sempre tiveram comigo e por, de forma consistente, contribuírem com a minha formação por tantos anos.

Aos meus colegas Léo, Henrique, Franciely, Sara e Fernanda, por terem sido a minha corrente e tornarem esse projeto tão seus quanto meu nos muitos meses de parceria. Com certeza tornaram tudo mais leve em meio à pandemia e aos obstáculos inerentes à ciência e à pesquisa.

Aos meus pais, Dilma e José, que são a minha força e o meu motivo. Tudo será por vocês, sempre. À Karen e à Vanda, que são parte da minha família e nunca soltaram a minha mão. Só eu e vocês sabemos exatamente como foi toda essa trajetória, e dedico a vitória da conclusão a vocês também.

Aos meus sonhos, por serem tão autênticos e sinceros.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	2
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUÇÃO.....	11
REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1 Estratégia de busca .....	14
2 Resultados da busca .....	15
3 Mapa Conceitual.....	17
4 Revisão da literatura.....	18
4.1 Câncer de Endométrio .....	18
4.2 Diabetes e obesidade como fatores de risco.....	23
4.3 IR e IGF1-R.....	25
4.4 Metformina no câncer de endométrio e relação com o IGF-1R.....	28
JUSTIFICATIVA .....	34
HIPÓTESES.....	35
OBJETIVOS .....	36
Principal .....	36
Secundários .....	36
REFERÊNCIAS .....	37
ARTIGO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
PERSPECTIVAS .....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AKT	<i>AKT Serine/Threonine Kinase</i>
AKT2	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 2</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BMI	<i>Body Mass Index</i>
cDNA	DNA complementar
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1 protein coding gene</i>
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	<i>Endometrial Cancer</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELK1	<i>ETS-Transcription Factor ELK1</i>
FAMED	Faculdade de Medicina – UFRGS
FBXW7	<i>F-Box and WD Repeat Domain Containing 7 protein coding gene</i>

FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXO3	<i>Forkhead box O3 protein coding gene</i>
FU	<i>Fluorescence Units</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase protein coding gene</i>
GLP1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
GUS	<i><math>\beta</math>-glucuronidase gene</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina & Eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 protein coding gene</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-2	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 2
IGFBP	Proteína Ligadora do IGF
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6



INCA	Instituto Nacional de Câncer
INSR	<i>Insulin Receptor protein coding gene</i>
IR	Receptor da Insulina
IR-A	Subunidade A do Receptor da Insulina
IR-B	Subunidade B do Receptor da Insulina
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
IRS-2	<i>Insulin receptor substrate-2</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog gene</i>
LKB1	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPK3	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i>
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MF	<i>Metformin</i>
MKH1	<i>MEK kinase protein coding gene</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
MTG	<i>MitoTracker Green FM</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTR	<i>MitoTracker Red CMXRos</i>
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen</i>

NF-κB	<i>Nuclear fator kappa B</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX-2	<i>Paired box gene 2</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PIK3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PIK3R1	<i>Phosphatidylinositol -3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>
POLE	<i>DNA polymerase épsilon mutated carcinomas</i>
PPGGO	Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia - UFRGS
PPP2R1A	<i>Protein Phosphatase 2 Scaffold Subunit Aalpha</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPS6KB1	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase B1</i>
RT-qPCR	PCR quantitativo por transcrição reversa
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais

SHC1	<i>SHC-transforming Protein 1</i>
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
SRB	<i>Sulforhodamine B</i>
STAT3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
STZ	Estreptozotocina
TBS	Tris Buffered Saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
UEA	Unidade de Experimentação Animal – HCPA
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fluxograma da revisão sistematizada.....	6
Figura 2. Mapa conceitual.....	17
Figura 3. Estadiamento do câncer endometrial.....	23
Figura 4. Vias moleculares envolvidos no câncer de endométrio e obesidade.....	25
Figura 5. Sistema de sinalização do IGF-1R.....	28
Figura 6. Via de sinalização do IGF-1R.....	29

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Estratégia de busca de palavras-chave na base de dados PubMed.....14

Tabela 2. Resultados da busca bibliográfica nas diferentes bases de dados.....15

## RESUMO

**Introdução:** o câncer de endométrio é uma neoplasia com taxas crescentes de incidência e mortalidade. Avanços limitados no tratamento e comorbidades associadas impedem melhorias significativas nas taxas de sobrevivência. A obesidade e a diabetes mellitus são fatores de risco independentes para o carcinoma endometrial, devido a níveis elevados de IGF-1 e resistência à insulina contribuindo para essa associação. O aumento do receptor de IGF-1 elevado no câncer de endométrio está ligado ao crescimento tumoral através da via PI3K/Akt. A metformina tem se mostrado promissora no tratamento do câncer, incluindo endometrial, mas os mecanismos exatos subjacentes aos efeitos antineoplásicos da metformina ainda estão sendo investigados. **Métodos:** a análise *in vitro* usando a linhagem celular de carcinoma endometrial Ishikawa avaliou o impacto da metformina em um conjunto de parâmetros que determinam viabilidade celular através de microscopia óptica, espectrometria e citometria de fluxo. Um modelo xenográfico de câncer endometrial em camundongos nus, utilizando as células Ishikawa, foi utilizado para avaliar o efeito da metformina no crescimento tumoral, IGF-1 circulante (por ELISA) e expressão diferencial de genes da via IGF-1R usando RT-PCR. **Resultados:** experimentos *in vitro* demonstraram diminuição dose- e tempo-dependente na viabilidade e proliferação celular, bem como disfunção mitocondrial aumentada, indução de apoptose e parada do ciclo celular em G1 com o tratamento. Nos animais, a metformina diminuiu o crescimento do tumor, porém, não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais ou nos níveis séricos de IGF-1 entre os grupos. Na análise da expressão gênica, a metformina regulou negativamente vários genes envolvidos na via de sinalização do IGF-1R, incluindo AKT2, FOXO3, IGF1R, INSR, MAPK3, MTOR e SHC1. **Conclusões:** esses achados sugerem que a metformina tem potencial como agente terapêutico, por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular, através da indução de apoptose via disfunção mitocondrial e diminuição de proliferação. Além disso, os efeitos da metformina no câncer de endométrio envolvem a modulação da via do IGF-1R. Mais investigações são necessárias para determinar a eficácia e segurança da metformina no tratamento do câncer de endométrio.

**Palavras-chave:** metformina, câncer endometrial; receptor de IGF-1; viabilidade celular; receptor de insulina.

## ABSTRACT

**Background:** endometrial cancer (EC) is a prevalent cancer with rising incidence and mortality rates. Limited treatment advances and comorbidities have hindered significant improvements in survival rates. Obesity and diabetes mellitus are independent risk factors for EC, with elevated levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin resistance contributing to this association. High IGF-1 receptor (IGF-1R) in EC is linked to tumor growth through the PI3K/Akt pathway. Metformin shows promise in cancer treatment, including EC, but the exact mechanisms underlying metformin's anticancer effects are still being investigated. **Methods:** *in vitro* analysis using the Ishikawa endometrial carcinoma cell line evaluated the impact of metformin on a set of parameters that determine cell viability through microscopy, spectrometry and flow cytometry. A xenograft model of endometrial cancer in nude mice, using Ishikawa cells, was used to evaluate the effect of metformin on tumor growth, circulating IGF-1 (by ELISA) and differential expression of IGF-1R pathway genes using RT-PCR. **Results:** *in vitro* experiments demonstrated dose- and time-dependent reductions in cell viability and proliferation, as well as induced mitochondrial dysfunction, apoptosis, and cell cycle arrest with metformin treatment. Animal studies revealed that metformin prevented tumor development and decreased tumor growth. However, no significant differences in animal body weight or IGF-1 serum levels were observed between control and treatment groups. Gene expression analysis indicated that metformin downregulated several genes involved in the IGF-1R signaling pathway, including AKT2, FOXO3, IGF1R, INSR, MAPK3, MTOR, and SHC1. **Conclusions:** these findings suggest that metformin has potential as a therapeutic agent, due to its ability to decrease cell viability by inducing apoptosis via mitochondrial dysfunction and decreasing proliferation. Furthermore, the effects of metformin on endometrial cancer involve modulation of the IGF-1R pathway. More investigations are needed to determine the efficacy and safety of metformin in the treatment of endometrial cancer.

**Keywords:** metformin; endometrial neoplasm; receptor, IGF Type 1; cell survival; receptor, Insulin.

## INTRODUÇÃO

O endométrio é a camada mucosa que reveste o útero na sua face interna, e é dividido em camada funcional – constituída por glândulas desde o epitélio até o estroma; e camada basal – que envolve a base das glândulas e vasos do estroma<sup>1</sup>. Durante o ciclo menstrual, a proliferação celular no tecido é estimulada pelo estrogênio e, num segundo momento, as células estromais endometriais semelhantes a fibroblastos são induzidas a se diferenciar em células deciduais por estímulo da progesterona<sup>2</sup>. Devido à sua capacidade de resposta e adaptação em diferentes microambientes hormonais, o endométrio é suscetível a diversas patologias, incluindo a endometriose, hiperplasia e neoplasias.

Mundialmente, o câncer de endométrio tem aumentado a sua incidência e mortalidade associada. Nos países desenvolvidos, é uma das neoplasias mais prevalentes em mulheres, principalmente na América do Norte e na Europa Ocidental, e está provavelmente associado a fatores de risco relacionados ao estilo de vida. Um total de 417.367 diagnósticos foram feitos em 2020 no mundo<sup>3; 4</sup>. No Brasil, o câncer de endométrio é a segunda neoplasia que mais acomete o trato genital feminino, com a estimativa de aparecimento de 7.840 novos casos de câncer de corpo do útero para cada ano do triênio 2023-2025. O risco estimado para cada 100 mil mulheres é de 7,08 casos<sup>5</sup>.

Câncer de corpo uterino é um termo que geralmente se refere ao carcinoma endometrial, responsável por cerca de 90% dos casos nessa classificação<sup>6; 7</sup>. Ele se desenvolve na porção epitelial do tecido, muito frequentemente progredindo a partir da hiperplasia endometrial, principalmente quando em presença de atipias nucleares<sup>8</sup>. O carcinoma endometrial apresenta uma vasta heterogeneidade na sua morfologia e nas alterações moleculares.

Historicamente, o câncer de endométrio é classificado em tipos I e II, baseado em fatores clínicos e hormonais. O tipo I, em que o principal subtipo é o adenocarcinoma,



corresponde a cerca de 80% dos casos de câncer de endométrio. Ele é estrogênio-dependente, e está relacionado ao aumento das taxas de obesidade na população e com a diabetes mellitus. O adenocarcinoma é diagnosticado em estádios iniciais e, como consequência, geralmente apresenta melhor prognóstico. O câncer de endométrio tipo II é independente de hormônios, é mais agressivo e dá origem a metástases em estádios iniciais, sinalizando um prognóstico menos favorável<sup>9; 10; 11</sup>. Uma classificação histológica mais recente se baseia na morfologia tumoral e no grau do tumor (arquitetura glandular e grau nuclear), fazendo com que os diferentes tipos de câncer endometrial possam ser distinguidos entre si através da detecção precoce de mutações específicas<sup>6; 12</sup>.

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1) é produzido por diversos tipos celulares, principalmente por hepatócitos. Ele tem características tanto de hormônio quanto de fator de crescimento, capaz de produzir respostas locais e sistêmicas<sup>13; 14; 15</sup>. O receptor do IGF-1 (IGF-1R) é amplamente expresso no endométrio normal e no câncer endometrial, tanto no epitélio glandular como no estroma. O IGF-1 e seu receptor têm regulação transcricional com participação do estrogênio, e estimulam a proliferação celular nesse tecido<sup>16</sup>. Tem-se observado que ocorre o aumento da expressão IGF-1R no câncer, inclusive no de endométrio. No adenocarcinoma, foi constatada a superexpressão do IGF-1R, assim como o aumento dos níveis de IGF-1R fosforilado e da ativação via da AKT, quando comparado ao endométrio normal proliferativo<sup>17; 18</sup>. Foi proposto por Dai e colaboradores (2016) que esta via contribui para o risco de hiperplasia endometrial e de desenvolvimento do câncer de endométrio<sup>19</sup>.

A metformina (*1,1-dimethylbiguanide hydrochloride*) é uma biguanida oral e age como um agente hipoglicemiante. É uma das drogas mais utilizadas no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 pelo seu efeito importante na diminuição dos níveis plasmáticos de glicose<sup>20; 21; 22</sup>. Apesar do uso amplo dessa droga e a extensa investigação em torno dela, os seus mecanismos de ação exatos permanecem pouco claros. Supõe-se que ela atua em diversos

locais, mais especificamente no fígado, na mucosa gastrointestinal e no tecido muscular, de diferentes formas<sup>23</sup>. Ela também inibe a proliferação celular pela ativação da via da AMPK, que interfere com a via PI3K/AKT/mTOR<sup>24</sup>.

Além do seu reconhecido uso na diabetes, diversos estudos também já demonstraram seu papel no câncer, obesidade, doenças cardiovasculares, renais, hepáticas e neurodegenerativas<sup>20; 25; 26; 27; 28; 29</sup>. Já se sabe, também, da sua eficácia na Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), ao passo que aumenta a sensibilidade à insulina e permite a diminuição dos esteroides circulantes. Os efeitos sistêmicos observados são a normalização do ciclo menstrual das pacientes e o aumento da fertilidade<sup>30</sup>. Vários autores relacionaram a metformina à diminuição da proliferação celular em alguns tipos de câncer, nomeadamente câncer colorretal, câncer de mama, pâncreas, endométrio, entre outros <sup>24; 31; 32</sup>. Não se encontram esclarecidos os mecanismos pelos quais a metformina diminui a proliferação celular no câncer de endométrio, e, no presente estudo, propomos a investigação de uma via que possivelmente contribui para tal, que é a via do IGF-1R e seus ligantes.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 Estratégia de busca

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada nas bases de dados PubMed, Embase e Cochrane, com as seguintes palavras-chave: 1) câncer de endométrio, 2) metformina e 3) IGF-1R, utilizando os *MeSH Terms* e termos livres associados. A estratégia de busca completa utilizada no PubMed se encontra na tabela 1. Os mesmos termos foram traduzidos para as buscas nas bases Embase e Cochrane, de acordo com as suas especificações.

**Tabela 1.** Estratégia de busca de palavras-chave na base de dados PubMed.

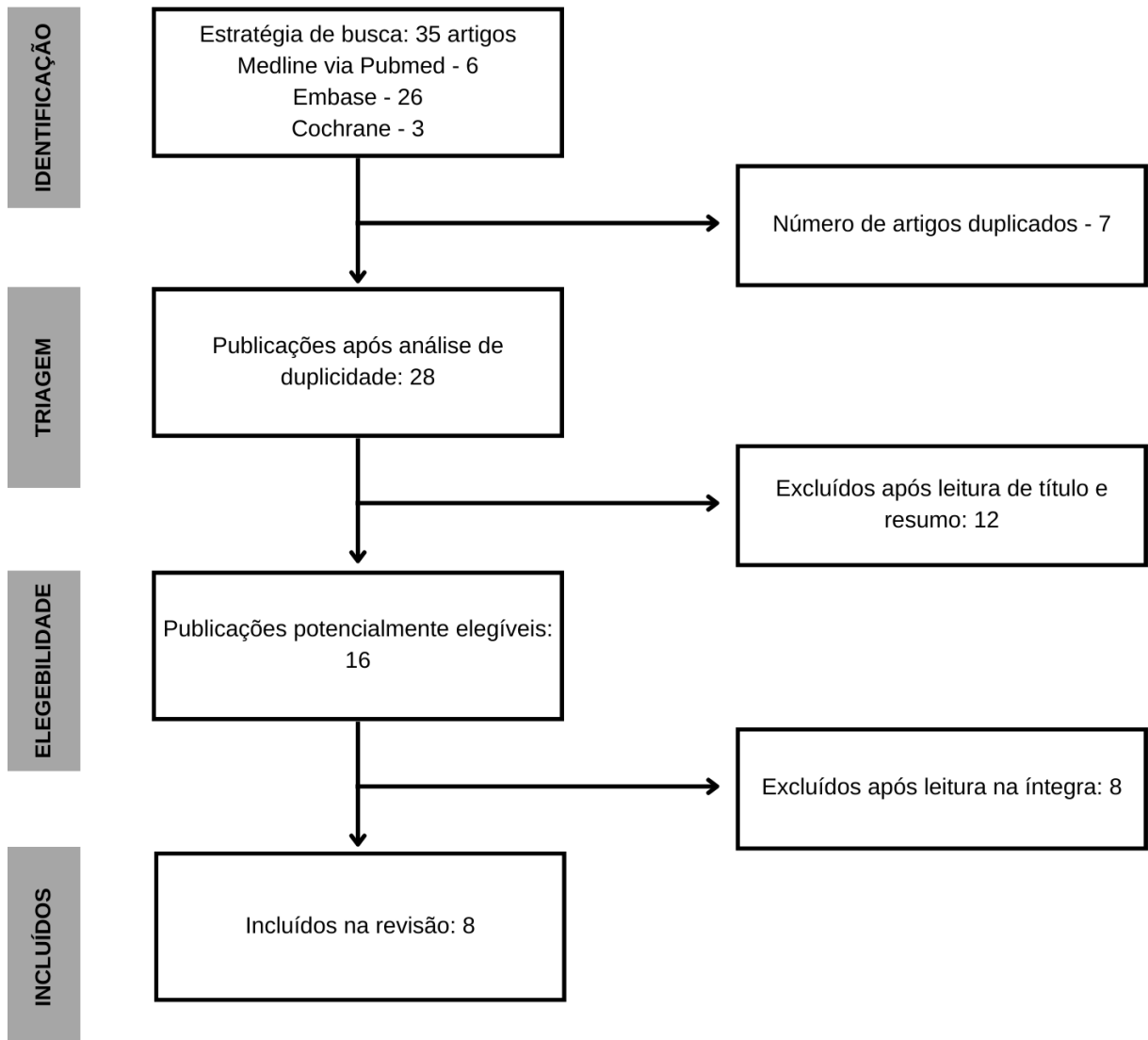
#1	(Endometrial Neoplasms OR Endometrial Neoplasm*[tw] OR Endometrial Carcinoma*[tw] OR Endometrial Cancer*[tw] OR Endometrium Cancer*[tw] OR Cancer of the Endometrium[tw] OR Carcinoma of Endometrium[tw] OR Endometrium Carcinoma*[tw] OR Cancer of Endometrium[tw])
#2	(Receptor, IGF Type 1 OR IGF-1R[tw] OR IGF1R[tw] OR IGF 1R[tw] OR IGF-1 Receptor*[tw] OR IGF 1 Receptor*[tw] OR IGF1 Receptor*[tw] OR Insulin-Like-Growth Factor I Receptor[tw] OR Insulin Like Growth Factor I Receptor[tw] OR IGF Type 1 Receptor[tw])
#3	(Metformin OR Metformin[tw] OR Dimethylbiguanidine[tw] OR Dimethylguanylguanidine[tw] OR Glucophage[tw])
#4	#1 AND #2 AND #3

## 2 Resultados da busca

**Tabela 2.** Resultados da busca bibliográfica nas diferentes bases de dados.

<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>	<b>Embase</b>	<b>Cochrane</b>
<b>Câncer de Endométrio</b>	36.840	82.295	2.599
<b>IGF-1R</b>	10.899	15.798	248
<b>Metformina</b>	28.049	84.387	12.500
<b>Câncer de endométrio AND IGF-1R AND Metformina</b>	6	26	3

Conforme a tabela 2, cruzando as palavras-chave, foram encontrados 6 artigos na base de dados PubMed, 26 na base Embase e 3 na plataforma Cochrane. Do total de 35 artigos, foram excluídos os duplicados e, através da leitura dos títulos e resumos, foram escolhidos os artigos pertinentes para este estudo, conforme demonstrado na figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma da revisão sistematizada.

### 3 Mapa Conceitual

Alguns dos fatores de risco para o câncer de endométrio, tais como a Síndrome Metabólica, a obesidade e a diabetes tipo 2, levam à resistência insulínica e, conseqüentemente, à hiperinsulinemia por tentativa de compensação da glicemia pelas células  $\beta$  pancreáticas. A insulina estimula a produção hepática do IGF-1, o que faz aumentar a sinalização do seu receptor que, entre outros efeitos, interfere com a proliferação celular e com o crescimento tumoral no câncer de endométrio. O trabalho pretende avaliar o efeito da metformina, droga muito utilizada no tratamento da diabetes tipo 2, no câncer de endométrio e estabelecer uma possível relação com a via de sinalização do IGF-1R, com possível efeito na proliferação e viabilidade celular.

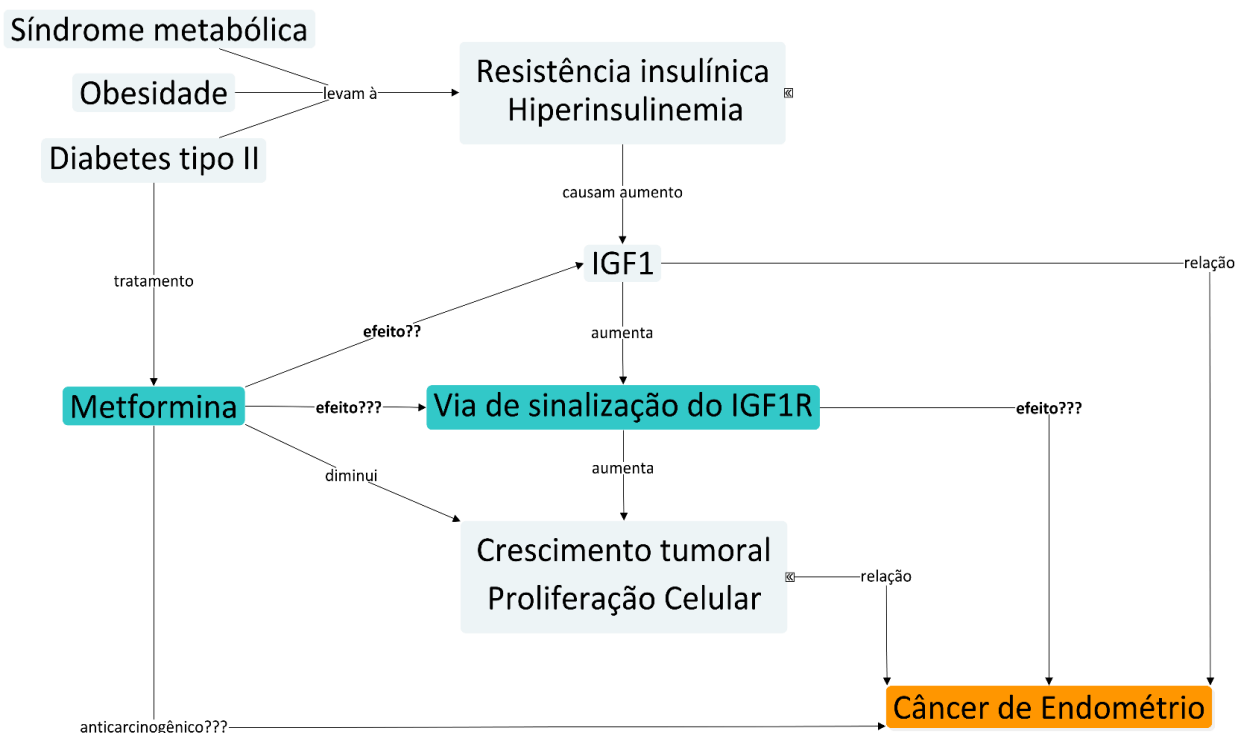


Figura 2. Mapa conceitual.

## 4 Revisão da literatura

### 4.1 Câncer de Endométrio

Entre os fatores de risco para o câncer de endométrio, encontram-se envolvidos fatores genéticos, obesidade, diabetes, nuliparidade, menopausa tardia, e o uso de terapias de reposição hormonal (TRH) sem oposição. Convencionalmente, o câncer endometrial é atribuído ao período pós-menopausa, visto que aproximadamente 80 a 90% dos casos ocorrem em mulheres acima dos 50 anos, enquanto 2 a 14% ocorrem em mulheres consideradas jovens, com idade menor que 40 anos<sup>33</sup>. A fim de prevenir a osteoporose, doenças cardiovasculares, demência e diversos outros sintomas da pós-menopausa, um número considerável de mulheres recorre à terapia de reposição hormonal<sup>34</sup>. Porém, ainda que os mecanismos envolvidos na evolução do carcinoma endometrial não estejam totalmente esclarecidos, sugere-se que o tratamento crônico com estrogênio exógeno, sem oposição por progestágenos, aumenta consideravelmente o risco de incidência do câncer de endométrio<sup>35</sup>.

Uma das apresentações clínicas mais comuns que direciona a investigação de câncer de endométrio é o sangramento uterino anormal, seja pós ou pré-menopausa. Uma meta-análise realizada por Clarke e colaboradores (2018) concluiu que aproximadamente 90% das pacientes com câncer de endométrio apresentam sangramento pós-menopausa inicialmente. Porém, no geral, o risco de diagnóstico de câncer de endométrio em mulheres que apresentam este sintoma varia de 3% a 25%, pois ele pode decorrer de outras condições, como pólipos, miomas, outras desordens endometriais e outras malignidades (exemplo: câncer de colo de útero)<sup>3; 36</sup>. A investigação ocorre, inicialmente, através da ultrassonografia transvaginal, usada para medir a espessura do endométrio. Este método é de fácil acesso, tem um bom custo-benefício e alta sensibilidade. No entanto, o diagnóstico definitivo deve ser feito através de biópsia endometrial com cânula, histeroscopia ou dilatação e curetagem<sup>37</sup>. A

histeroscopia com biópsia focal ou curetagem apresenta aproximadamente 99,2% de sensibilidade e 86,4% de especificidade no diagnóstico de câncer de endométrio<sup>38</sup>.

A incidência do câncer de endométrio em mulheres na idade pré-menopausa tem aumentando nos últimos anos devido ao aumento dos casos de diabetes e obesidade na população, que fazem parte dos fatores de risco consolidados para seu desenvolvimento<sup>39</sup>. Carcinomas não-diferenciados ou pouco diferenciados são mais frequentes em mulheres mais jovens, sendo geralmente relacionados à Síndrome de Lynch, e com baixa expressão de marcadores epiteliais e estromais. Tumores com porções indiferenciadas, mesmo que pequenas, apresentam comportamento mais agressivo<sup>40</sup>. A maioria dos diagnósticos feitos são de tumores do tipo I que se encontram em estágio inicial, o que favorece o prognóstico e se associa a uma taxa de sobrevida de aproximadamente 86%. Por outro lado, os diagnósticos de doença tipo II geralmente são em estágio avançado, com reincidência em três anos de 80 a 90% e sobrevida de 56%<sup>41; 42; 43</sup>.

A mais recente classificação do câncer de endométrio explora aspectos além das características clínicas das pacientes e dos padrões histológicos tumorais. Procurando novas formas de estratificar a doença e novos alvos terapêuticos, Kandoth e colaboradores (2013), em uma iniciativa do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), propuseram uma classificação baseada em dados de genoma, transcriptoma e proteoma, com potencial tradução para a clínica. O estudo foi feito com tumores endometrioides ( $n=307$ ), serosos ( $n=53$ ) e mistos ( $n=13$ ), e foram analisados o espectro de mutações, aberrações de número de cópias e *status* de instabilidade de microssatélites. Quatro grupos genômicos integrados foram propostos: POLE (ultramutado), MSI (hipermutado), número de cópias baixo (tipo endometriode) e número de cópias alto (tipo seroso)<sup>44</sup>.

O alto número de mutações no gene POLE, encontrado em aproximadamente 10% dos tumores endometrioides, foi associado com uma melhor sobrevida. O gene POLE codifica a subunidade catalítica da DNA polimerase, com papel na replicação do DNA. Além disso,



essa categoria se relaciona com mutações nos genes PTEN, PIK3R1, PIK3CA, FBXW7 e KRAS. O grupo MSI, de tumores endometrioides, é caracterizado por instabilidade de microssatélites devido à metilação do promotor MKH1, altas taxas de mutação, mutações nos genes KRAS e PTEN, entre outras. O grupo tumores com baixo número de cópias é composto por tumores endometrioides de grau 1 e 2 com estabilidade de microssatélite, baixas taxas de mutação e mutações frequentes no gene CTNNB1. Por fim, o grupo de tumores com alto número de cópias (tipo seroso) é caracterizado por extensivas aberrações de números de cópias e baixas taxas de mutação, mutações recorrentes nos genes TP53, FBXW7 e PPP2R1A, mas infrequente nos genes PTEN e KRAS, e é associado a um pior prognóstico<sup>44</sup>.

A nova classificação pode afetar diretamente as decisões sobre o tratamento e servir de guia para novos estudos clínicos baseados em terapias-alvo. Porém, o estudo feito não incluiu outros tipos de câncer de endométrio, como carcinosarcomas e carcinomas de células claras. Outras limitações observadas se referem à dificuldade de tipificar histologicamente os tumores de alto grau, até mesmo por patologistas ginecológicos com experiência, e à possibilidade de tumores endometrioides de alto grau classificados como subtipo alto número de cópias ter incluído tumores mistos na análise, onde apenas o componente endometriode foi analisado. Assim, Murali e colaboradores (2014) propõem o desenvolvimento de um sistema de classificação integrado incorporando tanto componentes moleculares como componentes clinicopatológicos<sup>10</sup>.

O tratamento padrão do câncer de endométrio é a cirurgia de histerectomia total com salpingooforectomia radical, eventualmente associada com linfadenectomia pélvica e para-aórtica<sup>37</sup>. A linfadenectomia é uma técnica ainda controversa pois não existe consenso em relação à melhora na sobrevida livre de doença<sup>45</sup>. Em alguns casos, dependendo de fatores clínicos, estadiamento, tipo histológico, e a presença ou não de invasão de tecidos adjacentes, é indicado o uso de terapias adjuvantes, como quimioterapia e radioterapia<sup>46</sup>. Esse tratamento ainda exclui casos de pacientes em idade reprodutiva que desejam manter a fertilidade. Por

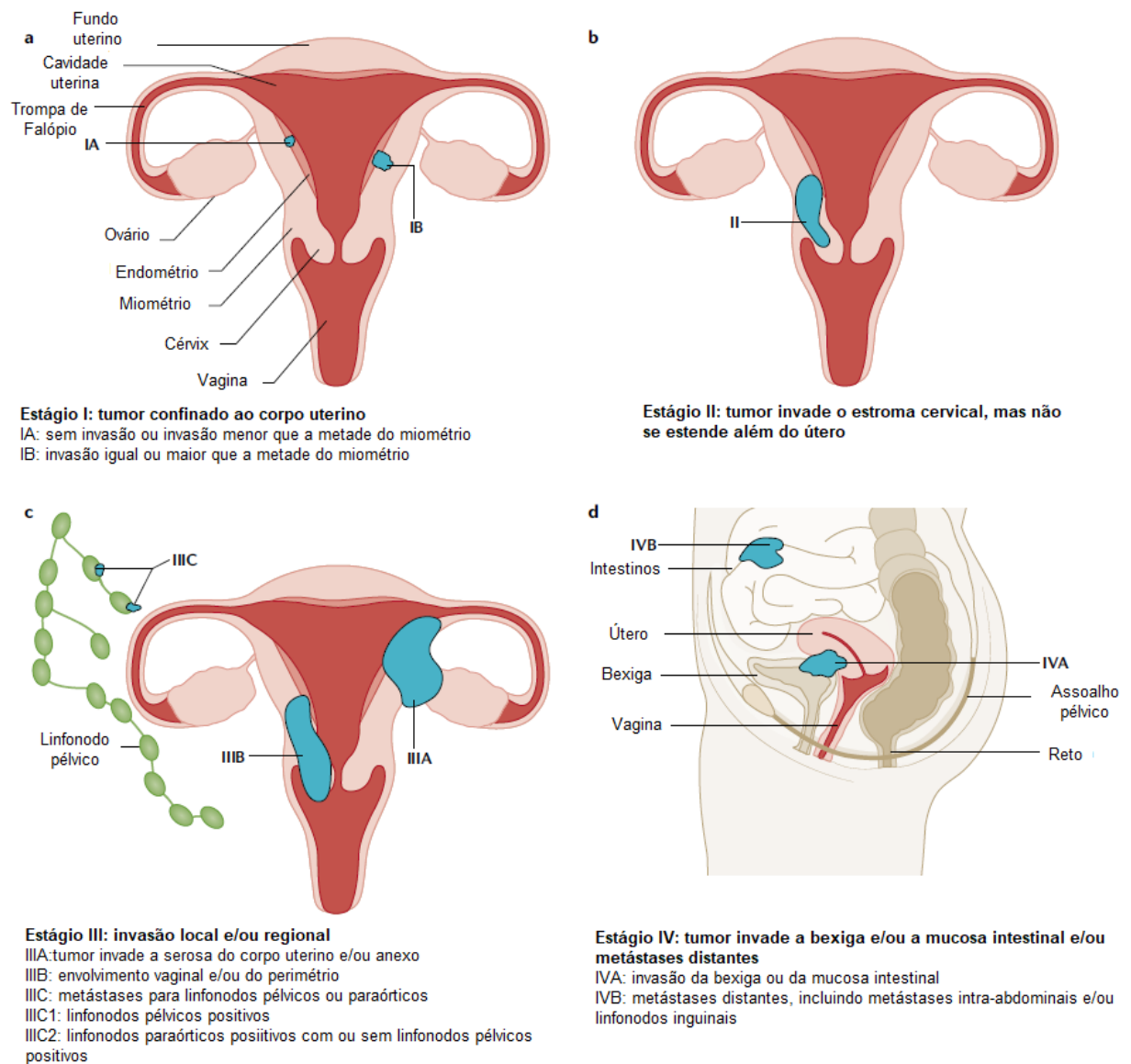
isso, é crescente a investigação em torno de opções de tratamento conservativos, ainda sem consenso entre especialistas<sup>47</sup>. No entanto, os tratamentos mais estudados no sentido de preservar a fertilidade feminina têm sido a terapia oral com progestágenos e, recentemente, a ressecção tumoral guiada por histeroscopia, seguida de terapia hormonal oral ou com dispositivos intra-uterinos que liberam hormônios<sup>48; 49; 50</sup>.

O estadiamento do câncer de endométrio é cirúrgico, de acordo com os critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Apesar desse fato, o estadiamento pré-operatório, através de exames de imagem, pode ser necessário em casos de pacientes sintomáticas com suspeita de comprometimento extrapélvico ou em pacientes com performance *status* baixo e que seja necessário excluir a possibilidade de doença metastática, por ser contraindicação da opção cirúrgica<sup>3</sup>. O estadiamento cirúrgico definido pela FIGO (figura 3) é composto por quatro estádios, que se baseiam na extensão uterina, invasão do miométrio e comprometimento de linfonodos pélvicos e paraórticos<sup>51</sup>. O estágio I se refere ao tumor limitado ao corpo uterino; o II, ao tumor com invasão do estroma cervical mas confinado ao útero; invasão local ou regional caracteriza o estágio III; e, por fim, o estágio IV ocorre quando há invasão da bexiga e/ou mucosa intestinal e/ou metástases distantes<sup>3</sup>.

O grau histológico para tumores endometrioides, definido com base no grau de diferenciação glandular, também é marcador prognóstico. Tumores grau 1 são aqueles com menos de 5% de crescimento não-glandular/não-escamoso observado no tecido; os de grau 2 variam de 6 a 50%; e tumores grau 3 apresentam mais que 50%. Para tumores endometriais de outros tipos histológicos, a classificação não segue o mesmo modelo. Existe uma classificação intrínseca para esses tumores, a exemplo de serosos, células claras e carcinomas indiferenciados<sup>52</sup>.

Em relação à prevenção do câncer de endométrio, ela é controversa na população de alto risco, como no caso de mulheres com diagnóstico de Síndrome de Lynch, mulheres em uso de Tamoxifeno para prevenção e tratamento do câncer de mama, e mulheres com SOP,

visto que não existem evidências de que as medidas propostas efetivamente diminuem o risco de desenvolver a patologia. Na população geral, Mackintosh e colaboradores (2018) sugerem que as estratégias de prevenção devem focar na minimização do risco através da redução do peso e na educação em saúde. Ainda, mencionam que estudos futuros podem vir a justificar os benefícios da adesão à quimioprevenção através de medicamentos como aspirina, metformina e bifosfonatos<sup>53</sup>.



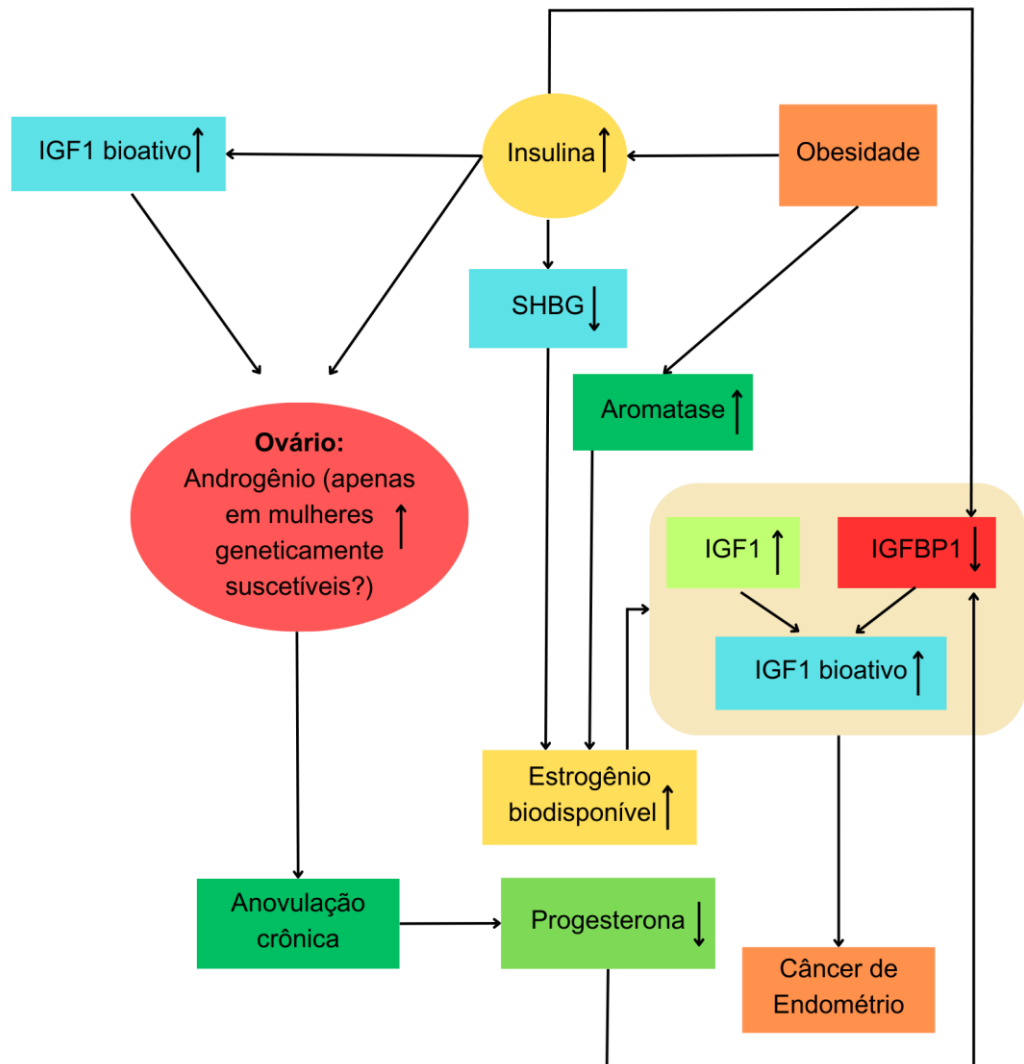
**Figura 3:** Estadiamento do câncer endometrial, adaptado de Makker *et al.* (2021).

#### 4.2 Diabetes e obesidade como fatores de risco

A diabetes tipo 2 (DM2), caracterizada por hiperglicemia e demais desordens metabólicas, está fortemente relacionada com o câncer de endométrio, conforme demonstram estudos epidemiológicos<sup>54; 55</sup>. As duas doenças compartilham características como a obesidade e o sedentarismo, porém, a DM2 é considerada como um fator de risco independente em diversos tipos de neoplasia, sem considerar o índice de massa corporal (IMC)<sup>56; 57</sup>. Estudos realizados *in vitro* sugerem que ocorre aumento na proliferação celular por mediação da insulina, do IGF-1 e dos hormônios esteroides ovarianos<sup>58</sup>.

Assim como a DM2, a obesidade, ou seja, o IMC calculado igual ou acima de 30 kg/m<sup>2</sup>, é um dos fatores de risco para o câncer de endométrio. Nas últimas décadas houve um aumento importante nas taxas de obesidade mundialmente, que triplicaram desde 1975, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). Mais de 50% dos casos de câncer de endométrio nos Estados Unidos ocorre, fundamentalmente, por causa do sobrepeso e da obesidade<sup>56</sup>.

Em um estudo realizado com mulheres do Reino Unido, cada aumento do IMC em 5 kg/m<sup>2</sup>, aumentou de forma significativa o risco de desenvolvimento de câncer de endométrio (RR 1,59; IC 95% 1,50–1,68)<sup>59</sup>. Isso ocorre não só por causa do hiperestrogenismo, mas também devido à resistência à insulina e hiperinsulinemia, que modulam a proliferação das células endometriais. Têm sido implicados, também, o ganho de gordura corporal e a ingestão excessiva de ácidos graxos, causando o aumento dos níveis de estrogênio circulante<sup>60</sup>.



**Figura 4:** Vias moleculares envolvidos no câncer de endométrio e obesidade, adaptado de Fader *et al.* (2009).

Os mecanismos mais fortemente associados entre obesidade e câncer são os efeitos metabólicos e endócrinos da obesidade, descritos na figura 4<sup>61</sup>. A proliferação endometrial ocorre principalmente pelos hormônios estrogênio e progesterona e, em mulheres obesas, ocorre a conversão de androstenediona para estrona e a aromatização de andrógenos para estradiol no tecido adiposo periférico. Esse mecanismo leva à estimulação mitogênica constante, sem a devida oposição da progesterona<sup>62</sup>. A evolução – ao longo dos anos – para resistência à insulina e aumento plasmático de insulina e glicose levam à estimulação ovariana

e, possivelmente, estimulação adrenal para síntese de hormônios andrógenos. Esses fatores também afetam os níveis plasmáticos de SHBG, afetando a quantidade de estrogênio ativo, que por consequência aumenta o IGF-1 biodisponível<sup>63</sup>.

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino, e a obesidade se relaciona a um estado inflamatório sistêmico crônico, em que o tecido adiposo produz tanto fatores anti quanto pró-inflamatórios, e está ligado ao aumento da resistência insulínica. Adipocinas, TNF- $\alpha$ , leptina, interleucina-6 (IL-6) e resistina são alguns dos fatores pró-inflamatórios que interferem com a sinalização do IR e estão associados com o câncer de endométrio<sup>60</sup>.

#### **4.3 IR e IGF1-R**

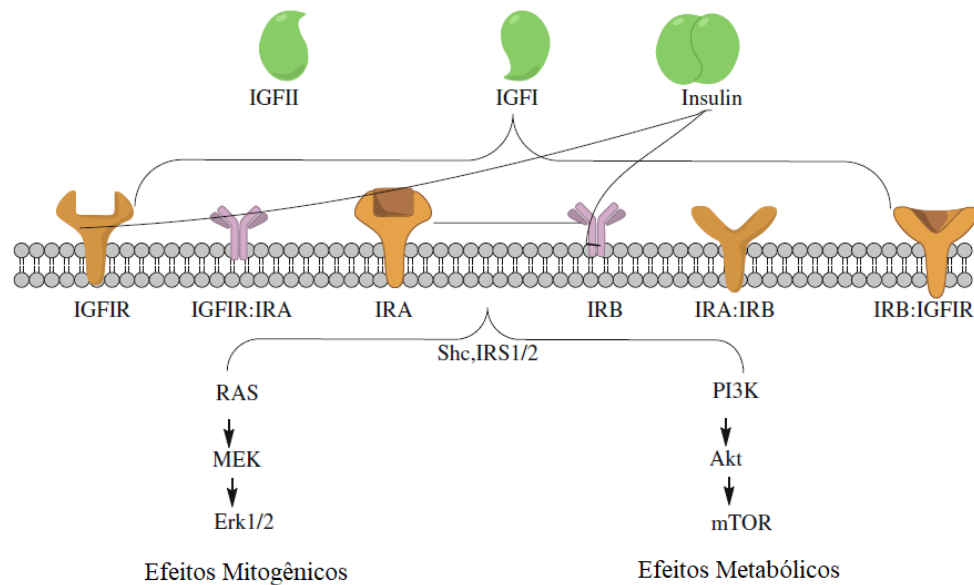
Hiperinsulinemia se refere ao estado de excesso de insulina na corrente sanguínea, provocado pela resistência à insulina. A resistência à insulina leva a uma diminuição da captação de glicose pelas células, principalmente musculares. Isto causa o aumento dos níveis de glicose na circulação, ou seja, leva à hiperglicemia. Como tentativa de compensação, o pâncreas endócrino aumenta a sua produção de insulina, levando à hiperinsulinemia<sup>58</sup>.

Uma metanálise realizada por Yap e colaboradores (2008) analisou estudos clínicos e epidemiológicos que apontaram uma ligação entre a resistência à insulina e o câncer de endométrio<sup>64</sup>. Os mecanismos para esta associação não estão bem esclarecidos, mas acredita-se que ocorra de duas formas. De forma indireta, os altos níveis de insulina e o aumento da biodisponibilidade do IGF-1 inibem a síntese hepática da SHBG, o que resulta no aumento de hormônios sexuais livres estimulando o endométrio. Ainda, ambos os hormônios atuam estimulando a síntese ovariana de esteroides sexuais que promovem a proliferação celular no epitélio endometrial e inibem a apoptose<sup>65</sup>. E de forma direta, através do receptor de insulina (IR) e ativação do IRS-1 que, por sua vez, ativa a PI3K e a MAPK. Essa via tem

como alvo o metabolismo de lipídios e carboidratos, promovendo a proliferação e a sobrevivência celular<sup>58</sup>.

O IR consiste em duas subunidades  $\alpha$  (extracelulares) idênticas, de 130 kDa, contendo os domínios de ligação da insulina; e duas subunidades  $\beta$  (transmembranares) de 95 kDa, que contém os domínios com atividade tirosina quinase. Quando a insulina se liga ao seu receptor, ela o ativa através da autofosforilação, que desencadeia a ativação de várias moléculas intracelulares como, por exemplo, o substrato do receptor da insulina e o SHC-*transforming protein* (Shc), que por sua vez vão gerar uma resposta biológica<sup>66: 65</sup>. O IR possui duas isoformas (IR-A e IR-B) que partilham propriedades biológicas e funcionais. O IR-B regula a entrada de glicose na célula e o metabolismo celular; e o IR-A, que apresenta maior afinidade pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2<sup>14</sup>, com efeitos apoptóticos e mitogênicos. O IR-A está geralmente superexpresso em múltiplos cânceres<sup>67</sup>.

A insulina e o IGF são homólogos em 40 a 80%, e o sistema de sinalização insulina/IGF envolve principalmente 3 ligantes: IGF-1, IGF-2 e a insulina (figura 5). Esses ligantes podem interagir com até 6 receptores: o IGF-1R, o IR-A, o IR-B, receptores híbridos do IGF-1R e IR-A, híbridos do IGF-1R e IR-B e híbridos entre IR-A e IR-B. Ainda, existem 6 proteínas ligadoras do IGF (IGFBP)<sup>18</sup> que modulam a biodisponibilidade das IGFs. Esse sistema controla a mitogênese, diferenciação e sobrevivência em células normais e cancerígenas<sup>68</sup>.



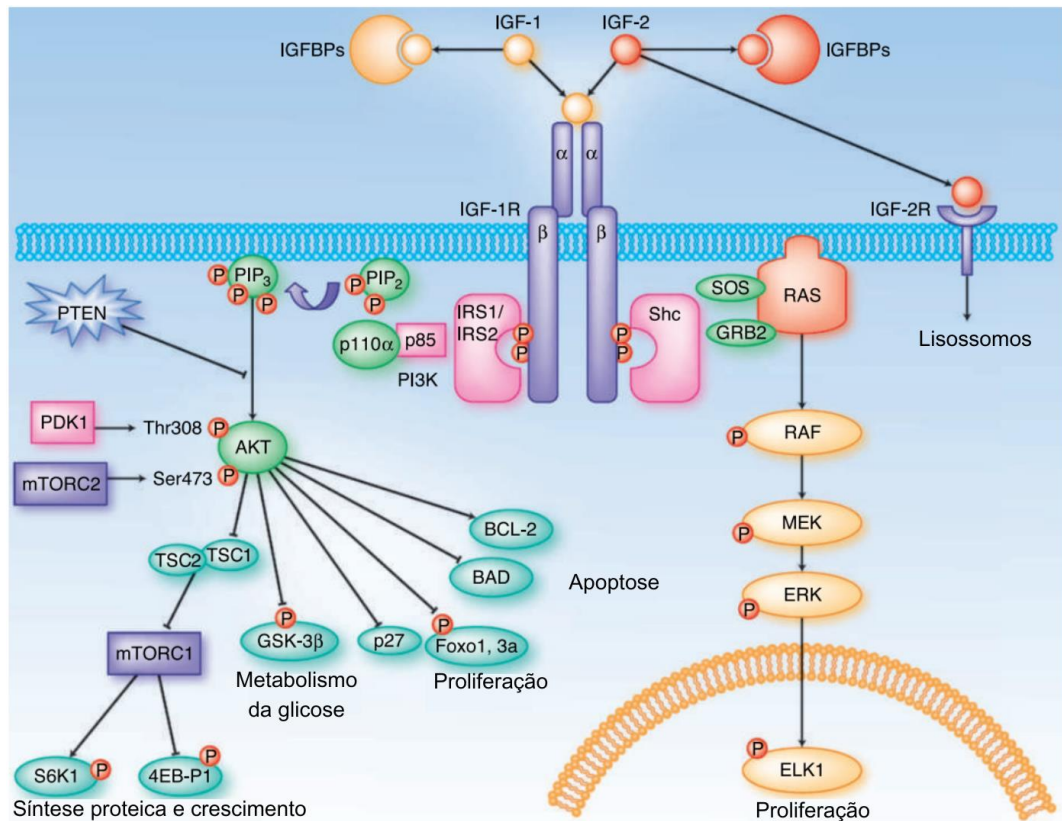
**Figura 5:** Sistema de sinalização do IGF-1R, adaptado de Singh *et al.* (2013).

De maneira semelhante ao IR, o IGF-1R é ativado por interação com os seus ligantes, quando se autofosforila e recruta moléculas adaptadoras como a IRS-1, IRS-2 e Shc. O IRS-1 se liga à subunidade regulatória da PI3K, estimulando sua atividade e aumentando os níveis de PIP3 (*phosphatidylinositol (3,4,5) -trisphosphate*). Isso leva ao recrutamento da Akt para a membrana, onde ela é fosforilada e ativada pela PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) e pelo mTOR. A ativação da Akt leva a efeitos anti-apoptóticos através da fosforilação inibitória de fatores pró-apoptóticos e de membros dos fatores de transcrição FOXO, assim como do aumento de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2, BCL-XL e NF- $\kappa$ B. A Akt também regula a ativação da GSK-3 $\beta$ , participante do metabolismo da glicose. A ativação da Shc leva à ativação da via RAS/MAPK e da via ELK1 (*ETS-Transcription Factor ELK1*), envolvida com a transdução de sinais mitogênicos, conforme ilustrado na figura 6<sup>69</sup>.

Vários fatores relacionados à hiperinsulinemia, como a SOP, a Síndrome Metabólica e a diabetes, podem influenciar a proliferação endometrial por meio de ações diretas ou indiretas. Dessa forma, Campagnoli e colaboradores (2013) chegaram a propor o uso de metformina como um agente preventivo do carcinoma endometrial, pois a metformina,



juntamente com uma mudança no estilo de vida, diminui esses fatores, inibindo a proliferação celular endometrial anormal <sup>70</sup>.



**Figura 6:** Via de sinalização do IGF-1R, adaptado de Zha e Lackner (2010).

#### 4.4 Metformina no câncer de endométrio e relação com o IGF-1R

A metformina, geralmente, é a droga inicial de escolha no tratamento da diabetes mellitus tipo 2, por melhorar a resistência à insulina nos tecidos periféricos e os níveis glicêmicos dos pacientes. Além disso, ela é segura ao ser combinada com outras drogas antidiabéticas, incluindo a insulina, e é tolerada por pacientes com níveis de glicose normais<sup>71</sup>. Ela atua na captação periférica de glicose, na diminuição dos níveis plasmáticos de insulina e no aumento da sensibilidade à insulina<sup>72</sup>. É utilizada, também, em gestantes com diagnóstico prévio de DM2, naquelas com diabetes gestacional e em pacientes com SOP<sup>20</sup>.

O efeito anti-hiperglicêmico da metformina ocorre principalmente através da supressão da produção hepática de glicose de forma dependente e não-dependente da AMPK. Entre outros mecanismos, ela também age promovendo uma maior captação de glicose no músculo esquelético, pelo do transporte através do GLUT4 (*glucose transporter 4*); e diminuindo a absorção intestinal de glicose. Ainda, estimula a liberação de GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*), que resulta na diminuição da glicemia<sup>20</sup>.

A nível celular, a metformina age inibindo a produção de ATP mitocondrial e ativando a via LKB1/AMPK, envolvido no metabolismo celular e no controle de crescimento na supressão tumoral<sup>73</sup>. Por sua vez, a AMPK inibe a proliferação celular através da sinalização da mTOR, já descrito como importante no desenvolvimento do câncer de endométrio, dentro da via PI3K/AKT/mTOR. A alteração dessa via já foi frequentemente associada a casos de câncer de endométrio relacionados com a obesidade e a diabetes<sup>74</sup>.

Em relação ao mecanismo independente da AMPK, a metformina inibe a atividade a GPDH mitocondrial e aumenta os níveis citoplasmáticos de NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen*) e o estado redox do citosol, causando uma diminuição da gliconeogênese hepática através do lactato<sup>75</sup>. Estudos *in vitro* realizados em hepatócitos mostraram que a metformina tem um efeito inibitório leve no complexo respiratório mitocondrial 1, resultando em mudança do estado de energia da célula<sup>23; 76</sup>.

DeCensi e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática e metanálise para observar o efeito da metformina na incidência do câncer e na mortalidade em pacientes diabéticos, após estudos epidemiológicos mostrarem que ela diminui o risco de câncer (em qualquer local) nesses pacientes. Utilizaram estudos observacionais e ensaios clínicos, totalizando 11 artigos (todos, exceto um, retrospectivos) avaliados após aplicar os critérios de exclusão. Observaram uma relação inversamente proporcional entre o uso da metformina e a incidência do câncer e mortalidade pela doença, com redução de 31% em pacientes diabéticos em uso de metformina em relação a outros medicamentos antidiabéticos<sup>77</sup>.

Karadeniz e colaboradores (2019) descrevem a metformina como uma droga que fornece proteção multifacetada contra a tumorigênese devido às suas diferentes possíveis ações, incluindo as que já estão sendo estudadas e aquelas desconhecidas. Entre elas, são mencionadas as seguintes: (1) diminuição da proliferação celular e potencial metastáticos através da via PI3K/AKT/mTOR; (2) a diminuição do complexo respiratório mitocondrial 1 e redução da produção de ATP; (3) efeitos anti-angiogênicos e anti-inflamatórios que antagonizam a obesidade; (4) inibição das vias da NF-κB e STAT3, diminuindo a produção do fator de necrose tumoral; (5) atividade anti-aromatase, reduzindo níveis de estrogênio circulantes; (6) prevenção da transformação de células tumorais em células tronco cancerígenas; (7) aumento de E-caderinas e diminuição da transição epitelial-mesenquimal; (8) ativação de *check-points* de resposta a danos ao DNA, agindo contra mecanismos de invasão e metástases e (9) aumento de micro-RNAs que normalizam células epiteliais pré-malignas, diminuindo suas propriedades embrionárias<sup>78; 79</sup>.

Uma das teorias estudadas sugere que a metformina tem o seu efeito antineoplásico de forma mais eficiente em tumores que existem em paralelo com a resistência insulínica e com a obesidade, e que esse efeito é principalmente inibindo a proliferação celular exacerbada<sup>79; 80</sup>. Uma metanálise feita por Tang e colaboradores (2017), incluindo 11 estudos observacionais, concluiu que o uso da metformina por pacientes com diabetes está relacionado à diminuição da incidência de câncer de endométrio em 13% e que o seu uso também está envolvido na melhora da sobrevida global desses pacientes. Os autores concluem indicando que esse medicamento pode ser uma potencial alternativa no tratamento de pacientes com câncer de endométrio e diabetes concomitantemente, contudo reconhecendo as limitações em relação ao estabelecimento de causalidade<sup>81</sup>.

O estrogênio é, sabidamente, um dos fatores de crescimento atuantes no endométrio, proveniente principalmente dos ovários (em mulheres com potencial reprodutivo), mas também de tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo, onde andrógenos são convertidos

a estrona e estradiol pela enzima aromatase. A obesidade não só aumenta a atividade da aromatase quanto diminui a quantidade de SHBG sérica, tornando maior a quantidade de estrogênio ativo na circulação. O estrogênio promove o crescimento de células do câncer de endométrio através da regulação da transcrição gênica, e de efeitos não-genômicos associados a cascatas de sinalização de quinases citoplasmáticas (a exemplo da PI3K e da MAPK, geralmente hiperativas em tumores) e a associação direta com receptores de membrana celular, como no caso do IGF-1R<sup>60</sup>.

Markowska e colaboradores (2013), a partir da observação da expressão aumentada dos receptores do estrogênio, progesterona e IGF-1 no câncer de endométrio e da mutação nos genes  $\beta$ -catenina e *PAX-2*, estudaram o efeito da metformina nesses fatores em mulheres com câncer de endométrio e diabetes mellitus tipo 2, através de marcação imunohistoquímica. As amostras utilizadas foram de câncer com histologia endometriode (tipo 1) de mulheres no período pós-menopausa, diabéticas e que fizeram uso de metformina ou sulfonilureia/insulina e de mulheres não-diabéticas como controle. O estudo constatou diferença significativa na expressão de IGF-1R entre mulheres com e sem diabetes, mas não houve diferença entre os diferentes tipos de tratamentos antidiabéticos<sup>82</sup>.

Com vistas a avaliar a hipótese de que o mecanismo de ação da metformina envolve a inibição da via do IGF-1, Sarfstein e colaboradores (2012) utilizaram a droga em diferentes linhagens celulares de carcinoma seroso uterino, nomeadamente ECC-1, Ishikawa, USPC-1 e USPC-2. Foi utilizada a concentração de 10 mM de metformina em cultura, com e sem a presença de IGF-1 na dose de 50 mg/mL, por 24 horas, e foram realizadas diversas análises de migração e proliferação celular, de ciclo celular e da potencial regulação da expressão e ativação do IGF-1R por fosforilação. Com o estudo, demonstraram que a metformina tem potente ação apoptótica e anti-mitogênica nas linhagens celulares utilizadas, em parte mediada pelo IGF-1R. Eles sugeriram que a ação inibitória da metformina não depende do

*status* da proteína p53 nas células, pois as linhagens utilizadas ou continham genes da p53 selvagem ou expressavam uma p53 mutante<sup>83</sup>.

Um estudo feito por Zhang e colaboradores, em 2015, mostrou que os níveis de IGF-1 circulantes não diferem em pacientes com e sem câncer de endométrio. Ainda, mostrou que a expressão de IGF-1R nas glândulas no epitélio endometrial de mulheres com carcinoma endometrial se encontra muito aumentada em relação ao endométrio não neoplásico. *In vitro*, verificaram que a metformina a 10 mM diminuiu a viabilidade celular de duas linhagens de câncer endometrial (Ishikawa e JEC), e ela foi capaz de reduzir a concentração de IGF-1 no meio de cultura e a expressão da subunidade intracelular do IGF-1R. Os autores concluíram que a metformina atua na diminuição da atividade da via PI3K/AKT, que resulta na diminuição do crescimento tumoral no modelo que eles estudaram<sup>84</sup>.

Zhang, Celestino e colaboradores (2013) estudaram o efeito da metformina e da estreptozotocina (STZ), que é um agente antineoplásico com efeito tóxico para as células beta pancreáticas (produtoras de insulina), na proliferação endometrial promovida pelo estrogênio. O modelo animal utilizado para os experimentos foi descrito por Nguyen-Yamamoto (1994) e por Argiles<sup>85</sup>, que definiram que ratos obesos Zucker fa/fa são ideais para estudar distúrbios relacionados à insulina, como hiperinsulinemia e resistência insulínica. Eles trataram os animais com uma solução salina, estradiol e metformina (300 mg/kg corporal, via oral por gavagem) juntamente com estradiol, por 3 semanas. Após análises, observaram que animais tratados com metformina tiveram os níveis de glicose diminuídos, mas não os de insulina, quando comparados aos controles, nas 3 semanas de tratamento. O que vai de acordo com a observação de que a metformina age na captação de glicose pelas células periféricas e no aumento da sensibilidade à insulina, e não na produção do hormônio em si. A longo prazo, o aumento do uso da insulina pelo organismo poderia refletir na diminuição do hormônio circulante conforme observado em outros estudos (8 a 10 semanas de tratamento)<sup>80</sup>.

Embora tenha sido utilizada clinicamente por mais de 40 anos, ainda existem diversas lacunas quanto ao mecanismo de ação da metformina. Diversos estudos foram ou ainda estão sendo conduzidos no sentido de esclarecer os efeitos, vias de ação e consequências do tratamento a longo prazo com o fármaco em diversos tipos de câncer, incluindo o endometrial<sup>25; 77; 86</sup>. Propõe-se que a metformina seja capaz de agir como quimiopreventivo e como terapia no câncer de endométrio, quando associada a outras terapias convencionais.

## JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o número de casos de câncer de endométrio aumentou significativamente nos países desenvolvidos. O IGF-1R tem um papel importante na tumorigênese do endométrio, por ter aumento relacionado às condições consideradas fatores de risco no carcinoma endometrial (hiperinsulinemia, diabetes e obesidade). No entanto, os resultados apresentados por estudos que têm como alvo o IGF-1 e o IGF-1R são controversos, e os mecanismos pela qual a metformina exerce o seu efeito no câncer de endométrio não estão completamente esclarecidos. O modelo murino permite estudar múltiplas características no desenvolvimento de tumores e permite observar a ação sistêmica do tratamento experimental. A técnica de enxertia de tumores humanos em camundongos torna possível a compreensão da tumorigênese e estudos da eficácia clínica de medicamentos. Já o modelo *in vitro* permite um estudo mais detalhado sobre a toxicidade do medicamento, assim como dos principais mecanismos de ação envolvidos no efeito observado com a entrega de uma dose controlada em cultura.

## **HIPÓTESES**

H0: A metformina não é capaz de inibir a proliferação celular e o crescimento tumoral e, na dose e tempo determinados, resulta em expressão gênica similar dos genes alvo na cascata de sinalização do IGF-1R no câncer endometrial, em relação aos controles.

H1: A metformina é capaz de inibir a proliferação celular e o crescimento tumoral e, na dose e tempo determinados, resulta em expressão gênica diferencial dos genes alvo na cascata de sinalização do IGF-1R no câncer endometrial, em relação aos controles.



## OBJETIVOS

### Principal

Analisar o efeito da metformina sobre o crescimento tumoral e sobre a sinalização do IGF-1R, em modelos *in vivo* e *in vitro* de câncer endometrial.

### Secundários

1. Avaliar a viabilidade e proliferação celular das células da linhagem Ishikawa em diferentes concentrações de metformina em cultivo celular;
2. Observar a atividade mitocondrial e os níveis de apoptose na linhagem celular de câncer endometrial após tratamento com metformina, *in vitro*.
3. Avaliar o efeito do tratamento com metformina na proliferação celular, através da expressão proteica do marcador Ki-67, do câncer de endométrio, em um modelo *in vivo*;
4. Observar o crescimento tumoral (volume da massa tumoral) do câncer de endométrio e os níveis de IGF-1 circulante em um modelo xenográfico, após tratamento com metformina;
5. Analisar a expressão dos genes IGF1R, IGF1, IGF2, INSR, IRS1, MTOR, RPS6KB1, MAPK3, AKT2, PIK3CA, SHC1 e FOXO3, participantes da via de sinalização do IGF-1R, após tratamento com metformina, no câncer de endométrio no modelo *in vivo*;

## REFERÊNCIAS

- 1 JABBOUR, H. N. et al. Endocrine regulation of menstruation. **Endocr Rev**, v. 27, n. 1, p. 17-46, Feb 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160098> >.
- 2 MARUYAMA, T.; YOSHIMURA, Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. **Endocr J**, v. 55, n. 5, p. 795-810, Oct 2008. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580040> >.
- 3 MAKKER, V. et al. Endometrial cancer. **Nat Rev Dis Primers**, v. 7, n. 1, p. 88, Dec 9 2021. ISSN 2056-676x.
- 4 SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 05 2021. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338> >.
- 5 (INCA), I. N. D. C. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA 2022.
- 6 YEN, T. T. et al. Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. **Int J Gynecol Pathol**, v. 39, n. 1, p. 26-35, Jan 2020. ISSN 0277-1691 (Print).
- 7 KOSKAS, M. et al. Cancer of the corpus uteri: 2021 update. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 155 Suppl 1, p. 45-60, Oct 2021. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34669196> >.
- 8 DOHERTY, M. T. et al. Concurrent and future risk of endometrial cancer in women with endometrial hyperplasia: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 15, n. 4, p. e0232231, 2020. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32343732> >.
- 9 COLOMBO, N. et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 24 Suppl 6, p. vi33-8, Oct 2013. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078661> >.
- 10 MURALI, R.; SOSLOW, R. A.; WEIGELT, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 7, p. e268-78, Jun 2014. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24872110> >.

- 11 OPLAWSKI, M. et al. Identification of a gene expression profile associated with the regulation of angiogenesis in endometrial cancer. **Mol Med Rep**, v. 16, n. 3, p. 2547-2555, Sep 2017. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656251> >.
- 12 KURMAN, R. J.; VISVANATHAN, K.; SHIH, I. M. Bokhman's dualistic model of endometrial carcinoma. Revisited. **Gynecol Oncol**, v. 129, n. 2, p. 271-2, May 2013. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582581> >.
- 13 BLUNDELL, T. L. et al. Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 1, p. 180-4, Jan 1978. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/272633> >.
- 14 DJIOGUE, S. et al. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. **Endocr Relat Cancer**, v. 20, n. 1, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207292> >.
- 15 SAJID, W. et al. Structural and biological properties of the Drosophila insulin-like peptide 5 show evolutionary conservation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 661-73, Jan 07 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974844> >.
- 16 KLEINMAN, D. et al. Modulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors and membrane-associated IGF-binding proteins in endometrial cancer cells by estradiol. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2531-7, Jun 1995. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7750475> >.
- 17 POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 3, p. 159-69, Feb 16 2012. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337149> >.
- 18 MERRITT, M. A. et al. Insulin/IGF and sex hormone axes in human endometrium and associations with endometrial cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v. 27, n. 6, p. 737-48, 06 2016. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125830> >.
- 19 DAI, C. et al. Insulin-like growth factor 1 regulates growth of endometrial carcinoma through PI3k signaling pathway in insulin-resistant type 2 diabetes. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 8, p. 3329-36, 2016. ISSN 1943-8141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648123> >.
- 20 LV, Z.; GUO, Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 11, p. 191, 2020. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32425881> >.

- 21 NESTLER, J. E. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1, p. 47-54, Jan 03 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172174> >.
- 22 SHAO, T. et al. Discovery of 2-methoxy-3-phenylsulfonamino-5-(quinazolin-6-yl or quinolin-6-yl)benzamides as novel PI3K inhibitors and anticancer agents by bioisostere. **Eur J Med Chem**, v. 75, p. 96-105, Mar 21 2014. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530495> >.
- 23 THOMAS, I.; GREGG, B. Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. **Pediatr Diabetes**, v. 18, n. 1, p. 10-16, 02 2017. ISSN 1399-5448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28052534> >.
- 24 HECKMAN-STODDARD, B. M. et al. Repurposing old drugs to chemoprevention: the case of metformin. **Semin Oncol**, v. 43, n. 1, p. 123-133, Feb 2016. ISSN 1532-8708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970131> >.
- 25 GANDINI, S. et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 7, n. 9, p. 867-85, Sep 2014. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985407> >.
- 26 LAMANNA, C. et al. Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Diabetes Obes Metab**, v. 13, n. 3, p. 221-8, Mar 2011. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205121> >.
- 27 BREINING, P. et al. Metformin targets brown adipose tissue in vivo and reduces oxygen consumption in vitro. **Diabetes Obes Metab**, v. 20, n. 9, p. 2264-2273, 09 2018. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29752759> >.
- 28 PATRONE, C.; ERIKSSON, O.; LINDHOLM, D. Diabetes drugs and neurological disorders: new views and therapeutic possibilities. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 3, p. 256-62, Mar 2014. ISSN 2213-8595. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24622756> >.
- 29 NEVEN, E. et al. Metformin prevents the development of severe chronic kidney disease and its associated mineral and bone disorder. **Kidney Int**, v. 94, n. 1, p. 102-113, 07 2018. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29716795> >.

- 30 LIVINGSTONE, C.; COLLISON, M. Sex steroids and insulin resistance. **Clin Sci (Lond)**, v. 102, n. 2, p. 151-66, 02 2002. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834135> >.
- 31 COYLE, C. et al. Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol**, v. 27, n. 12, p. 2184-2195, 12 2016. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681864> >.
- 32 ZHANG, Z. J.; LI, S. The prognostic value of metformin for cancer patients with concurrent diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Obes Metab**, v. 16, n. 8, p. 707-10, Aug 2014. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24460896> >.
- 33 SOROSKY, J. I. Endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, v. 120, n. 2 Pt 1, p. 383-97, Aug 2012. ISSN 0029-7844.
- 34 MARJORIBANKS, J. et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, n. 1, p. CD004143, Jan 17 2017. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28093732> >.
- 35 WAN, J. et al. The positivity of G-protein-coupled receptor-30 (GPR 30), an alternative estrogen receptor is not different between type 1 and type 2 endometrial cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 90897-90904, Oct 31 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29207611> >.
- 36 CLARKE, M. A. et al. Association of Endometrial Cancer Risk With Postmenopausal Bleeding in Women: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Intern Med**, v. 178, n. 9, p. 1210-1222, Sep 01 2018. ISSN 2168-6114. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30083701> >.
- 37 BRAUN, M. M.; OVERBEEK-WAGER, E. A.; GRUMBO, R. J. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. **Am Fam Physician**, v. 93, n. 6, p. 468-74, Mar 15 2016. ISSN 1532-0650. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977831> >.
- 38 CLARK, T. J. et al. Accuracy of hysteroscopy in the diagnosis of endometrial cancer and hyperplasia: a systematic quantitative review. **JAMA**, v. 288, n. 13, p. 1610-21, Oct 02 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12350192> >.
- 39 MOORE, K.; BREWER, M. A. Endometrial Cancer: Is This a New Disease? **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, v. 37, p. 435-442, 2017. ISSN 1548-8756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28561715> >.

- 40 HANLEY, K. Z.; BIRDSONG, G. G.; MOSUNJAC, M. B. Recent Developments in Surgical Pathology of the Uterine Corpus. **Arch Pathol Lab Med**, v. 141, n. 4, p. 528-541, Apr 2017. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28353387> >.
- 41 BROOKS, R. A. et al. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 69, n. 4, p. 258-279, Jul 2019. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31074865> >.
- 42 CONNOR, E. V.; ROSE, P. G. Management Strategies for Recurrent Endometrial Cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 18, n. 9, p. 873-885, Sep 2018. ISSN 1744-8328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29972650> >.
- 43 VAN NYEN, T. et al. Modeling Endometrial Cancer: Past, Present, and Future. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, Aug 09 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30096949> >.
- 44 KANDOTH, C. et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. **Nature**, v. 497, n. 7447, p. 67-73, May 02 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636398> >.
- 45 AALDERS, J. G.; THOMAS, G. Endometrial cancer--revisiting the importance of pelvic and para aortic lymph nodes. **Gynecol Oncol**, v. 104, n. 1, p. 222-31, Jan 2007. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126892> >.
- 46 VAN DEN HEERIK, A. S. V. M. et al. Adjuvant therapy for endometrial cancer in the era of molecular classification: radiotherapy, chemoradiation and novel targets for therapy. **Int J Gynecol Cancer**, v. 31, n. 4, p. 594-604, Apr 2021. ISSN 1525-1438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082238> >.
- 47 LUCCHINI, S. M. et al. Updates on conservative management of endometrial cancer in patients younger than 45 years. **Gynecol Oncol**, v. 161, n. 3, p. 802-809, 06 2021. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33892887> >.
- 48 CHEN, M. et al. Oncologic and reproductive outcomes after fertility-sparing management with oral progestin for women with complex endometrial hyperplasia and endometrial cancer. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 132, n. 1, p. 34-8, Jan 2016. ISSN 1879-3479. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493012> >.
- 49 PARK, J. Y. et al. Long-term oncologic outcomes after fertility-sparing management using oral progestin for young women with endometrial cancer (KGOG 2002). **Eur J Cancer**, v. 49, n. 4,

- p. 868-74, Mar 2013. ISSN 1879-0852. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23072814>>.
- 50 MAZZON, I. et al. Conservative surgical management of stage IA endometrial carcinoma for fertility preservation. **Fertil Steril**, v. 93, n. 4, p. 1286-9, Mar 01 2010. ISSN 1556-5653. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700153>>.
- 51 CREASMAN, W. T.; EDDY, G. L. Recent advances in endometrial cancer. **Semin Surg Oncol**, v. 6, n. 6, p. 339-42, 1990. ISSN 8756-0437. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2263809>>.
- 52 SOSLOW, R. A. et al. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. **Int J Gynecol Pathol**, v. 38 Suppl 1, n. Iss 1 Suppl 1, p. S64-S74, Jan 2019. ISSN 1538-7151. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30550484>>.
- 53 MACKINTOSH, M. L.; CROSBIE, E. J. Prevention Strategies in Endometrial Carcinoma. **Curr Oncol Rep**, v. 20, n. 12, p. 101, Nov 13 2018. ISSN 1523-3790 (Print).
- 54 STATTIN, P. et al. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 561-7, Mar 2007. ISSN 1935-5548. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17327321>>.
- 55 SAYDAH, S. H. et al. Abnormal glucose tolerance and the risk of cancer death in the United States. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 12, p. 1092-100, Jun 15 2003. ISSN 0002-9262. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796045>>.
- 56 CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738>>.
- 57 XUE, F.; MICHELS, K. B. Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 3, p. s823-35, Sep 2007. ISSN 0002-9165. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18265476>>.
- 58 MU, N. et al. Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, v. 125, n. 3, p. 751-7, Jun 2012. ISSN 1095-6859. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449736>>.

- 59 RENEHAN, A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-78, Feb 16 2008. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280327> >.
- 60 SCHMANDT, R. E. et al. Understanding obesity and endometrial cancer risk: Opportunities for prevention. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 205, n. 6, p. 518-525, 2011. ISSN 0002-9378 1097-6868. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2011.05.042> >.
- 61 FADER, A. N. et al. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. **Gynecol Oncol**, v. 114, n. 1, p. 121-7, Jul 2009. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406460> >.
- 62 LACEY, J. V. et al. Endometrial carcinoma risk among women diagnosed with endometrial hyperplasia: the 34-year experience in a large health plan. **Br J Cancer**, v. 98, n. 1, p. 45-53, Jan 15 2008. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026193> >.
- 63 O'MARA, B. A.; BYERS, T.; SCHOENFELD, E. Diabetes mellitus and cancer risk: a multisite case-control study. **J Chronic Dis**, v. 38, n. 5, p. 435-41, 1985. ISSN 0021-9681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3998058> >.
- 64 YAP, T. A. et al. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 393-412, Aug 2008. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721898> >.
- 65 ARCIDIACONO, B. et al. Insulin resistance and cancer risk: An overview of the pathogenetic mechanisms. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012. ISSN 1687-5214 1687-5303. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/789174> >.
- 66 KASHYAP, B. et al. Kaempferol 3-O-rutinoside from *Antidesma acidum* Retz. Stimulates glucose uptake through SIRT1 induction followed by GLUT4 translocation in skeletal muscle L6 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 301, 2023. ISSN 1872-7573 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2022.115788> >.
- 67 ERITJA, N. et al. Endometrial Carcinoma: Specific Targeted Pathways. **Adv Exp Med Biol**, v. 943, p. 149-207, 2017. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27910068> >.
- 68 SINGH, P.; ALEX, J. M.; BAST, F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. **Med Oncol**, v. 31, n. 1, p.



- 805, Jan 2014. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338270> >.
- 69 ZHA, J.; LACKNER, M. R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 9, p. 2512-7, May 01 2010. ISSN 1557-3265. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388853> >.
- 70 CAMPAGNOLI, C. et al. Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v. 29, n. 2, p. 119-24, Feb 2013. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946682> >.
- 71 CUSI, K. Metformin: A review of its metabolic effects. **Diabetes Care**, Diabetes Care, v. 6, n. 2, p. 89--131, 1998. ISSN 1935-5548.
- 72 WANG, Y. W. et al. Metformin: a review of its potential indications. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 2421-2429, 2017. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860713> >.
- 73 SHACKELFORD, D. B.; SHAW, R. J. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 563-75, Aug 2009. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629071> >.
- 74 IGLESIAS, D. A. et al. Another surprise from Metformin: novel mechanism of action via K-Ras influences endometrial cancer response to therapy. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2847-56, Dec 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24077915> >.
- 75 HE, L. Metformin and Systemic Metabolism. **Trends Pharmacol Sci**, v. 41, n. 11, p. 868-881, 11 2020. ISSN 1873-3735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32994049> >.
- 76 EL-MIR, M. Y. et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **J Biol Chem**, v. 275, n. 1, p. 223-8, Jan 07 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617608> >.
- 77 DECENSI, A. et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 3, n. 11, p. 1451-61, Nov 2010. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947488> >.
- 78 KARADENIZ, Z. et al. Inhibition of midkine by metformin can contribute to its anticancer effects in malignancies: A proposal mechanism of action of metformin in context of

- endometrial cancer prevention and therapy. **Med Hypotheses**, v. 134, p. 109420, Jan 2020. ISSN 0306-9877.
- 79 DEL BARCO, S. et al. Metformin: multi-faceted protection against cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 896-917, Dec 2011. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203527> >.
- 80 ZHANG, Q. et al. Chemopreventive effects of metformin on obesity-associated endometrial proliferation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 209, n. 1, p. 24e1-24e12, 2013. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2013.03.008> >.
- 81 TANG, Y. L. et al. Metformin Use Is Associated with Reduced Incidence and Improved Survival of Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 5905384, 2017. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28409158> >.
- 82 MARKOWSKA, A. et al. Does Metformin affect ER, PR, IGF-1R,  $\beta$ -catenin and PAX-2 expression in women with diabetes mellitus and endometrial cancer? **Diabetol Metab Syndr**, v. 5, n. 1, p. 76, Dec 5 2013. ISSN 1758-5996 (Print)
- 83 SARFSTEIN, R. et al. Metformin Downregulates the Insulin/IGF-I Signaling Pathway and Inhibits Different Uterine Serous Carcinoma (USC) Cells Proliferation and Migration in p53-Dependent or -Independent Manners. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L368765628&from=export> >. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061537> >.
- 84 ZHANG, Y. et al. Metformin down-regulates endometrial carcinoma cell secretion of IGF-1 and expression of IGF-1R. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 1, p. 221-5, 2015. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25640355> >.
- 85 KE, X. et al. The clinical and metabolic characteristics of children and adolescents with hypothalamic dysfunction: A single-centre study from China. **Clinical Endocrinology**, v. 98, n. 1, p. 59-67, 2023. ISSN 1365-2265. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/cen.14814> >.
- 86 EVANS, J. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503, p. 1304-5, Jun 04 2005. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849206> >.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados deste estudo possibilitam a ampliação das hipóteses quanto aos mecanismos de ação da metformina no câncer de endométrio. A metformina foi capaz de reduzir a viabilidade das células em cultura, de causar disfunção mitocondrial e de aumentar o processo de morte celular programada, através da apoptose. Por meio de análises de citometria de fluxo, foi possível observar que o tratamento foi capaz de causar uma parada do ciclo celular na fase G1.

De uma forma ainda mais evidente, o seu efeito no crescimento tumoral foi observado através da diminuição do volume tumoral no grupo tratado do nosso modelo animal. Em relação à possível ação da metformina de forma direta e indireta, através do nosso modelo não foi possível distinguir qual das vias teve maior participação no efeito observado, porém podemos inferir que a via do IGF-1R está ligada à fisiopatologia do câncer de endométrio e que ela é um dos alvos da ação terapêutica da metformina. Genes participantes da via do IGF-1R tiveram uma importante diminuição na expressão, avaliada por RT-PCR. Estudos mais detalhados com foco nos diferentes genes avaliados podem proporcionar um maior entendimento em relação à importância dessa via no mecanismo de ação da metformina no câncer endometrial.

## **PERSPECTIVAS**

Os resultados aqui expostos suscitam dúvidas e fornecem o embasamento necessário para prosseguir com as investigações em relação aos efeitos da metformina no câncer de endométrio. Um dos caminhos seria utilizar um modelo animal obeso com vistas a melhor observar o efeito da droga em presença de um dos fatores de risco mais importantes para o surgimento da doença. Além disso, o desenvolvimento de um protocolo que permite avaliar a metformina como agente de prevenção e como agente de tratamento do câncer de endométrio poderia esclarecer melhor o seu potencial de uso no câncer de endométrio. De um ponto de vista mais imediato, uma das propostas para esse trabalho é a dosagem de insulina sérica dos animais que participaram do estudo e a análise dos mesmos genes avaliados no tecido tumoral, dessa vez nas células da linhagem Ishikawa em cultura tratadas com metformina.